

文章编号:1674-2869(2015)03-0015-05

红花中羟基红花黄色素 A 的提取工艺

肖艳华,李艳艳,崔 猛,龚 焕

武汉工程大学化工与制药学院,湖北 武汉 430074

摘 要:采用单因素实验和 4 因素 3 水平正交实验,利用面积归一法,以高效液相检测羟基红花黄色素 A 的含量为指标,考察了羟基红花黄色素 A 提取工艺的影响因素,确定了最佳的溶剂浓度、溶剂用量、提取温度和超声时间. 结果表明超声提取时间对羟基红花黄色素 A 提取的影响最为显著,影响因素的主次顺序为: 超声时间 > 乙醇浓度 > 提取温度 > 溶剂用量. 最佳单因素为: 70% 的乙醇质量浓度、50 ℃ 的提取温度、体积比为 15 的溶剂用量、15 min 的超声时间; 最佳提取工艺为: 在 50 ℃ 下, 加入 10 倍量的质量分数 70% 乙醇, 超声提取 20 min, 固定提取次数为一次, 此时羟基红花黄色素 A 的提取含量最高.

关键词:羟基红花黄色素 A; 正交实验; 超声; 提取工艺

中图分类号: TB35

文献标识码: A

doi: 10. 3969/j. issn. 1674-2869. 2015. 03. 004

0 引 言

红花(*Safflower carthamus*)为菊科植物的干燥管状花. 具有活血通经,祛瘀止痛之功效,其药花性湿、味辛微苦. 红花中含有红色素和黄色素两种色素^[1],其中羟基红花黄色素 A(HSYA)为红花黄色素中药效最好,而且含量最多的一种查尔酮苷类化合物,是红花中最有效的水溶性成分^[2]. 研究表明,HSYA 结构如图 1,可有效抑制血小板激活因子的诱发血小板聚集和释放,可竞争性地抑制血小板激活因子与血小板受体的结合^[3-8],此外还用于保健品和化妆品中^[9]. 本实验利用正交设计,采用 $L_9(3^4)$ 正交表以 HSYA 的含量为标准进行实验,探讨了 HSYA 的最佳提取条件,为红花制剂的质量控制标准提供了科学依据.

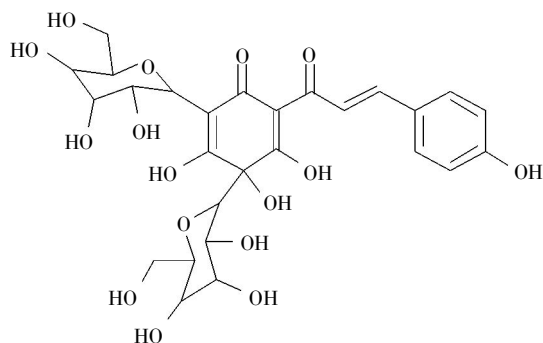


图 1 羟基红花黄色素 A 的结构

Fig.1 The structure of hydroxy safflower yellow A

1 实验部分

1.1 仪器与试剂

KQ5200B 超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司),JY5002 电子天平(南京远拓科学仪器有限公司),DHG-9143B5-III 电热恒温鼓风干燥箱(上海新苗医疗器械有限公司),DIONEX, P680 HPLC Pump 高效液相色谱仪(戴安公司),ZF-20D 紫外可见分光光度计(巩义予华仪器有限责任公司).

所用药材红花样品由湖北襄阳隆中药业集团有限公司提供,经隆中药业肖作武总工鉴定,并保存于武汉工程大学化工与制药学院制药工程实验楼 706 室. 实验所用水为蒸馏水,高效液相所用试剂为色谱级,其它均为分析级.

1.2 质谱条件

鞘气:45 unit/min,喷雾电压:4.5 kV,加热毛细管温度:300 ℃,扫描方式:正离子扫描和负离子扫描,扫描质量范围:50~2 000.

LC-MS 分析结果:HSYA 的液相色谱条件(面积归一法):甲醇:质量分数 1.0% 乙酸缓冲液=3:7,流速:1.0 mL·min⁻¹,检测波长:320 nm,柱温:20 ℃,保留时间: $t=5.64$ min.

1.3 红花水提液的制备

精确称量红花药材 5 g,按料液比 100 mL·g⁻¹ 加入蒸馏水,置于超声容器中 60 min,静置 12 h,过滤浓缩定容至 50 mL,取 2 mL 再稀释至 50 mL 作为分析用样品.

收稿日期:2015-01-08

作者简介:肖艳华(1971-),女,湖北武汉人,副教授,博士. 研究方向:药物合成及天然产物的提取分离与活性研究.

1.4 方法学考察

1.4.1 精密度试验 取步骤 1.3 中供试液按 1.2 的色谱条件连续进样 6 次,测得 $t=5.64$ min 对应峰相对保留时间的 $RSD \leq 0.41\%$,相对峰面积 $RSD \leq 4.6\%$,可见仪器精密度良好.

1.4.2 重复性试验 精密称取 5 g 样品 6 份,按 1.3 的方法制得供试液,按 1.2 的色谱条件进样测得 $t=5.64$ min 对应峰相对保留时间的 $RSD \leq 0.35\%$,相对峰面积 $RSD \leq 3.4\%$,可见该方法重现性良好.

1.4.3 稳定性试验 取 1.3 供试液,分别在 0、2、4、8、12、16 h 按 1.2 的色谱条件进样,可测得 $t=5.64$ min 对应峰相对保留时间 $RSD \leq 0.46\%$,相对峰面积 $RSD \leq 1.9\%$,说明样品在 16 h 内稳定.

2 结果与讨论

2.1 单因素实验

2.1.1 乙醇质量浓度的影响 固定提取次数为一次,准确称量 2 g 红花药材 5 等份,分别加入 10 倍(v/v)量的水,质量分数 10%、40%、70%、95% 乙醇,室温条件下浸提 60 min,抽滤、浓缩后加水定容至 100 mL,不同浓度乙醇提取后 HSYA 的含量分析结果见图 2.

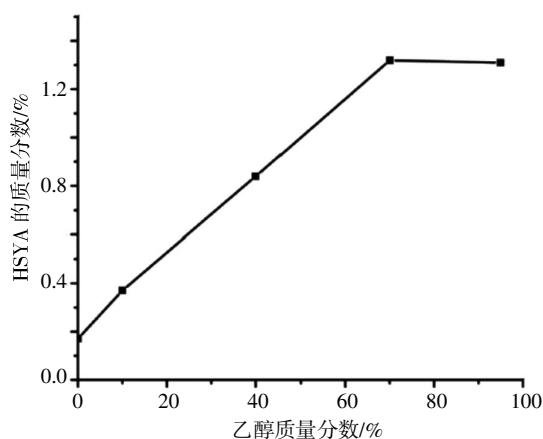


图 2 不同乙醇质量分数对 HSYA 质量分数的影响
Fig.2 Effect of different concentrations of ethanol on the content of HSYA

由图 2 可知,当乙醇质量分数达到 70%,HSYA 的提取已趋平衡.这个结果与 HSYA 的结构是相关的:HSYA 是一个含有两个单糖的双糖查尔酮苷,结构中的 12 个羟基使该物质有一定的亲水性,所以在查尔酮母核和糖的共同作用之下,HSYA 既有一定的亲水性,也有一定的亲脂性,实验表明,当乙醇质量分数为 70%时,对 HSYA 的溶解度达到最高.

2.1.2 提取温度的影响 准确称量 2 g 红花药材 5 等份,加入 10 倍(v/v)量的质量分数 70% 乙醇,

提取时间为 60 min,提取的温度分别为 20、30、40、50、60 $^{\circ}\text{C}$,抽滤、浓缩后加水定容至 100 mL.不同温度提取时 HSYA 的质量分数分析结果见图 3.

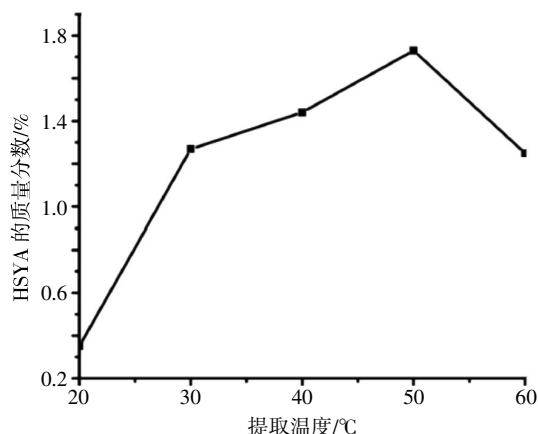


图 3 不同提取温度对 HSYA 质量分数的影响
Fig.3 Effect of different extraction temperature on the content of HSYA

由图 3 得,根据溶解原理,温度高溶解度会增大,所以当提取温度从 20 $^{\circ}\text{C}$ 升至 50 $^{\circ}\text{C}$ 时,HSYA 的质量分数是越来越高,当温度在 50 $^{\circ}\text{C}$ 时达到最高.但是如果继续提高提取温度到 60 $^{\circ}\text{C}$,发现其质量分数反而降低,这是因为 HSYA 结构中含有酚羟基、双键和苷键等易于氧化、水合和水解的官能团,温度持续的升高加大了 HSYA 形成醌、次生苷以及苷元的可能,使其含量急剧下降.通过此单因素实验确定其最佳提取温度是 50 $^{\circ}\text{C}$.

2.1.3 溶剂用量的影响 准确称量 2 g 红花药材 5 等份,分别加入 5、10、15、20、25 倍(v/v)量的质量分数为 70% 乙醇,50 $^{\circ}\text{C}$ 下浸提 60 min,抽滤、浓缩后加水定容至 100 mL,不同溶剂用量提取后 HSYA 的质量分数分析结果见图 4.

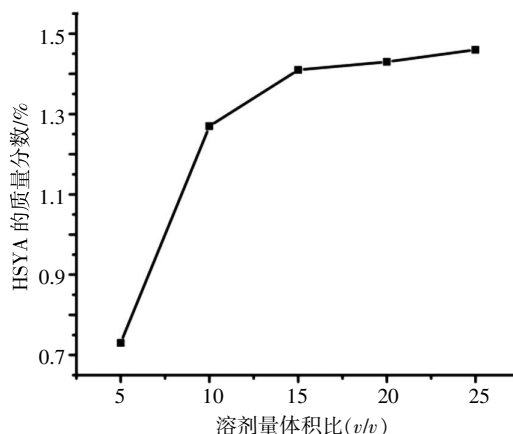


图 4 不同溶剂用量对 HSYA 质量分数的影响
Fig.4 Effect of different amounts of solvent on the content of HSYA

由图 4 可得,随着溶剂用量的增加,HSYA 的质量分数相应增大,说明增大溶剂用量有利于 HSYA

的充分提取.但是当红花药材和溶剂体积比到 15、20 和 25 倍时,HSYA 的质量分数基本成了一条直线,继续增加溶剂的用量,HSYA 质量分数并没有增加,说明体积比为 15 时提取已趋于完全,更多的提取溶剂只会增加后处理中蒸发溶剂的成本.

2.1.4 超声提取时间的影响 准确称量 2 g 红花药材 5 等份,加入 15 倍(v/v)量的质量分数为 70%乙醇,室温条件下分别超声提取 0、5、10、15、20 min,再依次静置浸提 60、55、50、45、40 min,抽滤、浓缩后加水定容至 100 mL.不同超声时间提取后,分析 HSYA 的质量分数,结果见图 5.

由图 5 可得,超声提取 15 min,HSYA 质量分数达到最高,延长超声时间 HSYA 含量下降,超声虽能在空化效应的作用下使得植物细胞壁及整个生物体破裂,有利于有效成分的溶出,但长时间的空化效应不仅会使植物破裂,也会引入更多的杂

质同时也使温度升高,而高温高压都有可能加速查尔酮苷的水解最终使得 HSYA 的质量分数下降.

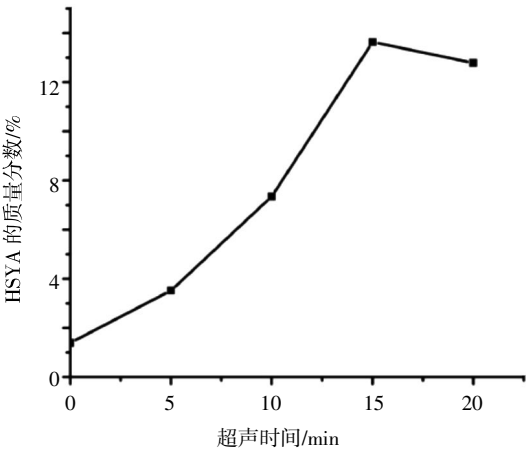


图 5 不同超声时间对 HSYA 质量分数的影响
Fig.5 Effect of different ultrasonic time on the content of HSYA

表 1 $L_9(3^4)$ 正交试验的因素和水平
Table 1 The factor and levels of orthogonal design

| 水平 | 影响因素 | | | |
|----|--------------|----------------|------------------------------|----------------|
| | 乙醇质量分数(A, %) | 溶剂量(B, v/v) | 提取温度(C, $^{\circ}\text{C}$) | 超声提取时间(D, min) |
| 1 | 60 | 10 | 40 | 10 |
| 2 | 70 | 15 | 50 | 15 |
| 3 | 80 | 20 | 60 | 20 |

表 2 正交试验设计和结果
Table 2 The orthogonal design and results

| 试验号 | 因素 | | | | HSYA 质量分数/% |
|------|-----------------|------------------|-----------------------------|-------------|-------------|
| | 乙醇质量分数(A)/% | 溶剂量(B)/(v/v) | 提取温度(C)/ $^{\circ}\text{C}$ | 超声时间(D)/min | |
| 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1.47q |
| 2 | 1 | 2 | 2 | 2 | 1.34 |
| 3 | 1 | 3 | 3 | 3 | 3.68 |
| 4 | 2 | 1 | 2 | 3 | 11.23 |
| 5 | 2 | 2 | 3 | 1 | 3.43 |
| 6 | 2 | 3 | 1 | 2 | 4.87 |
| 7 | 3 | 1 | 3 | 2 | 1.64 |
| 8 | 3 | 2 | 1 | 3 | 5.08 |
| 9 | 3 | 3 | 2 | 1 | 1.48 |
| K1 | 6.49 | 14.34 | 11.42 | 6.38 | |
| K2 | 19.53 | 9.85 | 14.05 | 7.85 | |
| K3 | 8.2 | 10.03 | 8.75 | 19.99 | |
| k1 | 2.16 | 4.78 | 3.81 | 2.13 | |
| k2 | 6.51 | 3.28 | 4.68 | 2.63 | |
| k3 | 2.73 | 3.34 | 2.92 | 6.66 | |
| 极差 R | 4.35 | 1.5 | 1.76 | 4.53 | |
| 主次顺序 | $D > A > C > B$ | | | | |
| 优水平 | A2 | B1 | C2 | D3 | |
| 优组合 | $A_2B_1C_2D_3$ | | | | |

通过以上单因素实验发现用 15 倍的质量分数为 70%乙醇在 50℃超声提取 15 min, HSYA 的质量分数达到最高。

2.2 正交实验

通过上述单因素实验结果,可以确定固定提取次数为一次的情况下,乙醇质量分数、溶剂用量、提取温度及超声时间对 HSYA 的提取有显著影响。选择乙醇质量分数(A)、溶剂量(B)、提取温度(C)、超声时间(D)四个因素考察,每因素各取 3 个水平,结合红花药材处理及对 HSYA 纯化尝试的实验经验,安排 $L_9(3^4)$ 正交试验表 1。

3 结 语

首先本实验采用单因素实验法,找出提取的最佳单因素点分别是:质量分数为 70%的乙醇为最佳比例;50℃为提取最佳温度;溶剂用量体积比为 15 时最佳;15 min 为超声最适时间。

然后以乙醇质量分数、溶剂用量、提取温度、超声时间为因素设计正交实验,分析正交试验结果可知,超声提取对 HSYA 的提取影响最为显著,影响因素的主次顺序为超声时间>乙醇质量分数>提取温度>溶剂量。以高效液相检测 HSYA 的质量分数为指标,超声时间对 HSYA 的提取有显著影响,超声时间控制在一定范围内,可充分提取 HSYA;乙醇质量分数对 HSYA 的影响次之,保持一定质量分数的乙醇,可以使 HSYA 完全溶解,保持 HSYA 的提取质量分数较高;严格控制温度,不仅可以提高 HSYA 的质量分数,还可以降低 HSYA 因受热水解变性的可能性;溶剂量的影响较小,在保证红花药材充分浸泡的前提下,可以适当减少溶剂用量,这样不仅降低了后处理的工作负荷,还降低了成本。本实验最终确定 HSYA 的最佳提取工艺为 $A_2B_1C_2D_3$,即 50℃下,加入 10 倍量的质量分数 70%乙醇超声提取 20 min 效果最佳。

致 谢

感谢武汉工程大学化工与制药学院提供的试验平台,感谢本实验室其他成员的帮助!

参考文献:

- [1] 中国科学院《中国植物志》编辑委员会.中国植物志.第 78(1)卷[M].北京:科学出版社,1987:187.
- [2] LIANG Z, WANG Y X, ZHOU Y, et al. Hydrolysis and coagulation behavior of polyferric sulfate and ferric sulfate [J]. Water Science and Technology, 2009, 59(6):

1129–1135.

- [3] VOEGELIN A, KAEGI R, FROMMER J, et al. Effect of phosphate, silicate, and Ca on Fe(III)-precipitates formed in aerated Fe(II)- and As(III)-containing water studied by X-ray absorption spectroscopy[J]. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 2010, 74(1): 164–186.
- [4] 董芳, 薛长江, 王宇, 等. 红花黄色素抑制血小板激活因子诱导的内皮细胞炎症因子蛋白表达升高作用的研究[J]. *心肺血管病杂志*, 2014(2): 281–285.
DONG Fang, XUE Chang-jiang, WANG Yu, et al. Inhibitory effect of safflower yellow on endothelium inflammatory factors expression elevation induced by platelet activating factor[J]. *Journal of Cardiovascular and Pulmonary Diseases*, 2014(2): 281–285. (in Chinese)
- [5] 高丽, 郭玉忠. 红花黄色素抗血小板聚集作用的研究[J]. *中医临床研究*, 2014, 6(9): 45–47.
GAO Li, GUO Yu-zhong. Research on effects of safflower yellow on antiplatelet aggregative activity [J]. *Clinical Journal of Chinese Medicine*, 2014, 6(9): 45–47. (in Chinese)
- [6] 臧宝霞, 吴伟, 陈红燕. 红花黄色素抑制血小板聚集和缓解心肌细胞缺氧缺糖损伤的作用[J]. *心肺血管病杂志*, 2012, 31(6): 736–739.
ZANG Bao-xia, WU Wei, CHEN Hong-yan. Inhibitory effect of safflower yellow on rabbit platelet aggregation induced by ADP and the protective effect on myocyte oxygen and glucose deprivation[J]. *Journal of Cardiovascular and Pulmonary Diseases*, 2012, 31(6): 736–739. (in Chinese)
- [7] 金鸣, 李家实, 陈文梅, 等. 红花成分抗血小板激活因子作用机理的研究[J]. *医学研究通讯*, 2002, 31(7): 26–26.
JIN Ming, LI Jia-shi, CHEN Wen-mei, et al. Research on the mechanism of the composition of safflower platelet activating factor[J]. *Bulletin of Medical Research*, 2002, 31(7): 26–26. (in Chinese)
- [8] 陈文梅, 金鸣. 红花黄色素抑制血小板激活因子介导的血小板活化作用的研究[J]. *中国药学杂志*, 2000, 35(11): 741–744.
CHEN Wen-mei, JIN Ming. Inhibition of safflower yellow on rabbit platelet activation induced by platelet activating factor[J]. *Chinese Pharmaceutical Journal*, 2000, 35(11): 741–744.
- [9] 杨丽华, 张敏, 马春. 红花的现代研究进展[J]. *中国老年学杂志*, 2007, 27(14): 1429–1430.
YANG Li-hua, ZHANG Min, MA Chun. Research development of safflower carthamus [J]. *Chinese Journal of Gerontology*, 2007, 27(14): 1429–1430. (in Chinese)

Extraction process of hydroxy safflower yellow A in Safflower carthamus

XIAO Yan-hua, LI Yan-yan, CUI Meng, GONG Huan

School of Chemical Engineering & Pharmacy, Wuhan Institute of Technology, Wuhan 430074, China

Abstract: According to the content of hydroxy safflower yellow A (HSYA) by high performance liquid chromatography, single factor experiments and orthogonal experiments (four factors three levels) were conducted to determine the optimal factors on the extraction of HSYA, such as the concentration of solvent, the amount of solvent, extraction temperature and extraction time. The results show that the ultrasonic extraction time is the most important factor and the order of the influential factors are ultrasonic extraction time>ethanol concentration>extraction temperature >solvent consumption. The conditions for the best single factor experiment are 70% ethanol concentration, 15 times of the volume ratio of solvent and ultrasonic extract for 15 minutes under 50 °C. The best extraction factor for the highest content of HSYA is adding 10 times of 70% ethanol extract only once for 20 minutes under 50 °C with ultrasonic.

Keywords: hydroxy safflower yellow A; orthogonal experiment; ultrasonic; extraction process

本文编辑:张 瑞